

Aus dem
Physiologisch-chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. Dr. F. May)

**3-O- α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose
aus *Streptococcus faecalis*
und ihre 2-Desoxy-derivate**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Josef Krieglstein
aus Pechgrün

Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1967

1967

Als Dissertation genehmigt von der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.

Sonderdrucke aus

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie,
Band 348, S. 1252 - 1260, Oktober 1967.

Dekan: Professor Dr. G. Ober

Referent: Professor Dr. Dr. F. May

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 1967

Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 348, S. 1252—1255, Oktober 1967

3-O- α -D-Glucopyranosyl- α . β -trehalose aus *Streptococcus faecalis*, III¹

Von WERNER FISCHER und JOSEF KRIEGLSTEIN*



(Der Schriftleitung zugegangen am 12. Juni 1967)

Zusammenfassung: Die aus *Streptococcus faecalis* isolierte 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose wurde als Hendecaacetat charakterisiert. Die bei partieller Säurehydrolyse auftretenden Produkte wurden getrennt und acetyliert. Die Acetylierungs-

produkte wurden als β -D-Glucose-pentaacetat, β -Nigerose-octaacetat und α,β -Trehalose-octaacetat identifiziert, wodurch die postulierte Struktur bestätigt wird.

Summary: 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose was isolated from *Streptococcus faecalis* and characterised as its hendecaacetate. The products of partial acid hydrolysis were separated and acetyla-

ted. The acetylation products were identified as β -D-glucose-pentaacetate, β -nigerose-octaacetate and α,β -trehalose-octaacetate, thus confirming the postulated structure.

Kürzlich isolierten wir aus *Streptococcus faecalis* ein nicht reduzierendes Oligosaccharid, das aus Glucose aufgebaut ist und bei der partiellen Spaltung mit verdünnter Mineralsäure oder Maltase zwei Disaccharide liefert, die durch Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese als Nigerose und α,β -Trehalose identifiziert wurden. Wir schlossen daraus auf das Vorliegen einer 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose² und konnten die postulierte Struktur durch die Ergebnisse der Periodatoxydation, Permethylierung und die spezif. Drehung $[\alpha]_D^{20}$: +139° bis +145° weiterhin sichern¹. In der vorliegenden Arbeit werden das Trisaccharid und die Produkte der partiellen Hydrolyse in Form ihrer Acetylderivate charakterisiert.

Ergebnisse

Aus 200 g Bakterien (Feuchtgewicht) wurden 5 g Trisaccharid gewonnen. Bei der Darstellung fanden sich in Übereinstimmung mit unseren früheren

Untersuchungen keine Anhaltspunkte für das Vorliegen von Disacchariden. Dünnschichtchromatographisch konnten zwei Verbindungen nachgewiesen werden, die langsamer als das Trisaccharid wandern, sich aber mit dem 3,5-Diamino-benzoesäure-Reagens in gleicher Weise anfärben (vgl. I. c.²), so daß mit dem Vorkommen höherer Oligosaccharide zu rechnen ist. Eine nennenswerte Funktion im Stoffwechsel dürfte ihnen kaum zukommen, da ihre Konzentration schätzungsweise unter 1% des Trisaccharidgehaltes liegt.

Das durch Chromatographie über eine Kohle-Celite-Säule gereinigte Trisaccharid wurde durch mehrmaliges Abziehen mit absol. Äthanol in Substanz erhalten. Kristallisationsversuche aus wäbr. Äthanol oder Aceton blieben erfolglos. Die feinpulvrige Substanz zeigte im Infrarotspektrum je eine Absorptionsbande bei 845 und 890 cm⁻¹, was den α - und β -Bindungstyp im Molekül bestätigt (vgl. I. c.³).

Ein Teil des Trisaccharids wurde acetyliert. Das Acetylderivat reduziert FEHLINGSche Lösung nicht. Es zeigt einen scharfen Schmelzpunkt bei 183 bis 184°C. Das gefundene Molekulargewicht von 943 (ber. 966) beweist das Vorliegen eines Hendecaacetyl-hexosetrisaccharids. Die spezif. Drehung

* Teil d. Dissertat. J. KRIEGLSTEIN (D 29).

** Postanschrift: Dr. W. FISCHER, 8520 Erlangen, Wasserturmstraße 3.

¹ II. Mitteil.: J. KRIEGLSTEIN u. W. FISCHER, diese Z. **344**, 209 [1966].

² W. FISCHER u. J. KRIEGLSTEIN, diese Z. **344**, 113 [1966].

³ S. A. BARKER, E. J. BOURNE, M. STACEY u. D. H. WHIFFEN, J. chem. Soc. [London] **1954**, 171.

$[\alpha]_D^{20}$: + 111° zeigt, wie aus Tab. 1 hervorgeht, zwei α -Bindungen und eine β -Bindung im Molekül an.

Tab. 1. Werte der spezif. Drehung für die Hendecaacetate der isomeren 3-*O*- α -D-Glucopyranosyl-trehalosen.

Berechnete Werte*	$[\alpha]_D^{20}$
Hendecaacetyl-	
3- <i>O</i> - α -D-glucopyranosyl- α , α -trehalose	+ 172,4°
3- <i>O</i> - α -D-glucopyranosyl- α , β -trehalose	+ 115,6°
3- <i>O</i> - α -D-glucopyranosyl- β , β -trehalose	+ 45,4°

* Die Berechnung erfolgte über die molaren Drehwerte, wie 1. c.¹ beschrieben.

Ein Teil des Trisaccharids wurde der partiellen Säurehydrolyse unterworfen. Die entstandenen Produkte wurden nach Entfernung der Säure durch Chromatographie über Cellulosesäulen getrennt. Hierbei wurden vier Verbindungen erhalten, die bei Papierchromatographie die R_F -Werte von Glucose, Nigerose, α , β -Trehalose und nicht gespaltener Glucotriose aufwiesen.

Die vier Verbindungen wurden acetyliert und als β -D-Glucose-pentaacetat, β -Nigerose-octaacetat, α , β -Trehalose-octaacetat und Glucotriose-hendecaacetat identifiziert.

Die physikalischen Daten der drei isomeren Trehalose-octaacetate sind in Tab. 2 zusammengestellt. Danach kann es sich bei der von uns aus dem Hydrolysat der Glucotriose dargestellten Verbindung nur um das α , β -Isomer handeln, womit dessen natürliches Vorkommen endgültig feststeht.

Unsere Verbindung stimmt hinsichtlich Schmelzpunkt und spezifischer Drehung mit denjenigen Präparaten von α , β -Trehalose-octaacetat überein, die durch Äthylenoxyd-Additionsreaktion von 2.3.4.6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucose und Tri-*O*-acetyl-1.2-anhydroglucose^{9,11} oder durch die KOENIGS-KNORR-Reaktion^{10,12} dargestellt wurden und hinsichtlich ihrer Struktur exakt untersucht sind¹¹.

Die nach partieller Säurehydrolyse nachgewiesenen und in Form ihrer Acetylderivate identifizierten Verbindungen lassen in Bestätigung unserer früheren Ergebnisse für das Oligosaccharid aus *Streptococcus faecalis* nur die Struktur einer 3-*O*- α -D-Glucopyranosyl- α , β -trehalose zu. Für die Bindung der dritten Glucoseeinheit am β -Anteil der Trehalose sei auf unsere Untersuchungen über die Maltasespaltung des Trisaccharids verwiesen¹.

Wir danken Herrn Professor Dr. B. HELFERICH, Bonn, für die Überlassung von α , β -Trehalose-octaacetat, Herrn

Tab. 2. Physikalische Daten der drei isomeren Trehalose-octaacetate.

	Schmp.	$[\alpha]_D$	Lit.
α , α -Trehalose-octaacetat	100—102°	+ 163°	4, 10
β , β -Trehalose-octaacetat	177—182°	— 17° bis — 19°	nach 1. c. ⁵
α , β -Trehalose-octaacetat	68—70°	+ 68°	6
	120°	+ 67°	7
	118°	+ 64°	7
	140°	+ 64,4°	8
	140—141°	+ 82°	9
	140°	+ 80°	10
	141—142°	+ 81,8°	11
	140—141°	+ 79,6°	12
Trehalose-octaacetat	144—144,5°	+ 83,2°	13
aus der Glucotriose	141—142°	+ 82,5°	

Dr. K. MATSUDA, Sendai Japan, und Herrn Professor Dr. S. PEAT, Bangor, Great Britain, für β -Nigerose-octaacetat. Danken möchten wir ferner Herrn Dr. A. HAAG und Herrn Dipl.-Chem. G. BITTNER (Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg) für die Anfertigung des Infrarotspektrums und die Molekulargewichtsbestimmung sowie Herrn Dipl.-Chem. H. GAEDCKE (Institut für Anorganische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg) für die DEBYE-SCHERRER-Aufnahme.

Beschreibung der Versuche

Darstellung des Trisaccharids: Die Züchtung von *Streptococcus faecalis* (Stammkultur aus dem Department of Bacteriology of Nebraska) erfolgte im flüssigen Nähr-

⁴ C. S. HUDSON u. S. M. JOHNSON, J. Amer. chem. Soc. **38**, 1566 [1916].

⁵ R. W. BAILEY, Oligosaccharides, p. 56, Pergamon Press, New York-London 1965.

⁶ H. V. VOGEL u. H. D. DEBOWSKA-KURNICKA, Helv. chim. Acta **11**, 910 [1928].

⁷ V. E. SHARP u. M. STACEY, J. chem. Soc. [London] **1951**, 285.

⁸ H. BREDERECK, G. HÖSCHELE u. K. RUCK, Chem. Ber. **86**, 1277 [1953].

⁹ W. N. HAWORTH u. W. J. HICKINBOTTOM, J. chem. Soc. [London] **1931**, 2847.

¹⁰ F. MICHEL u. K. O. HAGEL, Chem. Ber. **85**, 1087 [1952].

¹¹ R. U. LEMIEUX u. H. F. BAUER, Canad. J. Chem. **32**, 340 [1954].

¹² B. HELFERICH u. K. WEIS, Chem. Ber. **89**, 314 [1956].

¹³ B. HELFERICH, persönl. Mitteil., Daten des uns entgegenkommenderweise überlassenen Präparates.

medium, das 0,5% Galaktose, 0,5% Hefeextrakt, 1% $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ und 1% Pepton (aus Casein) enthielt. Die Bakterien wurden gegen Ende der Wachstumsphase vom Nährmedium abzentrifugiert und zweimal mit 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,2, gewaschen. Die Ausbeute betrug 200 g Bakterien (Feuchtgewicht) aus 50 l Nährmedium.

Die gesamte Bakterienmenge wurde zum Aufschluß der Zellen in 2,4 l 70proz. Äthanol 10 Min. bei 70°C erhitzt¹⁴. Nach Abfiltrieren wurde der Rückstand noch zweimal mit je 1 l 70proz. Äthanol in der gleichen Weise extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vak. eingeeengt und zur Entfernung des Äthanols mehrmals mit Wasser abgezogen. Die so erhaltene Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphase zweimal mit Wasser gewaschen.

Die wäbr. Lösung wurde auf eine Kohle-Celite-Säule (27 × 7 cm) gebracht. Das Kohle-Celite-Gemisch (Darco G 60 und Celite 535, 1:1) war vorher mit 0,1M Citratpuffer, pH 7, Wasser und 20proz. Äthanol gewaschen und bei 80°C getrocknet worden. Die Elution von der Säule erfolgte nacheinander mit Wasser, 3-, 8-, 15- und 50proz. Äthanol. Man sammelte in Fraktionen von 500 ml, wobei mit Hilfe der MOLISCH'schen Probe auf die Anwesenheit von Kohlenhydraten geprüft wurde. Die Fraktionen mit positivem Ausfall wurden einzeln eingeeengt und mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser 7:2:1 unter Anfärbung mit dem 3,5-Diamino-benzoesäure-Reagens¹ untersucht. Die Hauptmenge des Trisaccharids fand sich in den mit 15proz. Äthanol eluierten Fraktionen. Im Eluat mit 50proz. Äthanol waren neben geringen Mengen an Trisaccharid zwei langsamer wandernde, noch nicht näher untersuchte Verbindungen nachweisbar.

Die das Trisaccharid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vak. zum Sirup eingeeengt. Das Trisaccharid wurde nach mehrmaligem Abdestillieren mit absol. Äthanol in Substanz erhalten.

Partielle Hydrolyse: Bei Hydrolyse in 0,2N H_2SO_4 auf dem siedenden Wasserbad ist nach papierchromatographischer Prüfung die Ausbeute an Disacchariden nach etwa 40 Min. am größten. Die partielle Hydrolyse wurde daher unter diesen Bedingungen mit 2 g Trisaccharid durchgeführt, wobei die Zuckerkonzentration 0,4% betrug. Anschließend wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert und das Filtrat zum Sirup eingeeengt.

Trennung der Hydrolysenprodukte: Die Trennung der Hydrolysenprodukte erfolgte auf 2 Cellulosesäulen (41 × 4,5 cm, Cellulosepulver Whatman, standard grade)¹⁵; es wurde mit Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser

7:1:2 chromatographiert und in Fraktionen von 5 ml gesammelt. Die Prüfung auf Anwesenheit von Zuckern geschah im Tüpfeltest auf Kieselgel G mit 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens¹. Nach dünnsschichtchromatographischer Untersuchung (Kieselgur G, Butanol-(1)/ α,α' -Lutidin/Wasser 6:3:1) der zuckerhaltigen Fraktionen waren von der Säule nacheinander Glucose, Nigerose, Trehalose und Glucotriose eluiert worden, wobei sich nur zwischen Nigerose und Trehalose Übergangsfractionen mit beiden Bestandteilen fanden.

Die einheitlich erscheinenden Fraktionen wurden vereinigt und eingeeengt, wobei eine intensive Trübung auftrat, die ausgeäthert werden konnte. Da die nochmalige Säulenchromatographie der Übergangsfractionen keine befriedigende Trennung brachte, wurden diese Fraktionen zur Gewinnung der im Hydrolysat in geringerer Menge vorhandenen Trehalose 45 Min. in gesätt. Bariumhydroxydlösung unter Rückfluß gekocht, wonach die Nigerose zerstört war. Es schloß sich Neutralisierung mit Schwefelsäure und die Reinigung der Trehalose durch Säulenchromatographie an.

Nach papierchromatographischer Prüfung erwiesen sich Glucose, α,β -Trehalose und das Trisaccharid als einheitlich, während Nigerose noch Spuren von Glucose enthielt.

Acetylierung: Die aus der partiellen Hydrolyse erhaltenen Verbindungen wurden durch mehrmaliges Abdestillieren mit absol. Äthanol in Substanz erhalten. Ihre Acetylierung erfolgte mit Natriumacetat und Essigsäureanhydrid¹⁶. In gleicher Weise wurden 2 g des ursprünglichen Trisaccharids acetyliert und die acetylierten Verbindungen aus 95proz. Äthanol durch Kristallisation gewonnen.

β -D-Glucose-pentaacetat: Das einzige nach partieller und totaler Hydrolyse (vgl. l. c.¹) nachweisbare Monosaccharid wurde als β -D-Glucose-pentaacetat identifiziert: Schmp. 130–131°C, nicht erniedrigt nach Beimischung authent. Substanz, $[\alpha]_D^{19}$: + 4,09° ($c = 3,69$, Chloroform). Literaturwerte¹⁶: Schmp. 132°, $[\alpha]_D^{20}$: + 4°.

β -Nigerose-octaacetat: Das Acetat der papierchromatographisch als Nigerose identifizierten Verbindung reduziert FEHLINGSche Lösung. Schmp. 150–151°C, nicht erniedrigt durch Beimischung authent. Substanz, $[\alpha]_D^{18}$: + 85,2° ($c = 1,45$, Chloroform). Literaturwerte: Schmp. 149–152°C, $[\alpha]_D$: + 84° bis + 86° (nach l. c.⁵). $C_{28}H_{38}O_{19}$ (678,6) Ber. C 49,55 H 5,64 Gef. C 49,86 H 5,76

α,β -Trehalose-octaacetat: Das Acetat der papierchromatographisch als α,β -Trehalose identifizierten Verbindung reduzierte FEHLINGSche Lösung auch nach längerem Kochen nicht, ergab jedoch eine starke Reduktion nach 7stdg. Erhitzen bei 90°C in 0,6proz. Salz-

¹⁴ N. MORIKAWA, Y. IMAE u. H. NIKAI, D. J. Biochemistry [Tokyo] **56**, 145 [1964].

¹⁵ L. HOUGH, Methods of Biochemical Analysis, Vol. I, p. 205. Interscience Publ., New York-London 1954.

¹⁶ M. L. WOLFROM u. A. THOMPSON in R. L. WHISTLER u. M. L. WOLFROM, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II, p. 211, Academic Press, New York-London 1963.

säure (Wasser/Aceton 1:1). Schmp. 141—142°C, nicht erniedrigt nach Beimischung authent. Substanz, $[\alpha]_D^{19}$: +82,5° ($c = 1,86$, Chloroform). Die in der Literatur mitgeteilten physikalischen Daten von α . β -Trehalose-octaacetat sind in Tab. 2 zusammengestellt.

$C_{28}H_{38}O_{19}$ (678,6) Ber. C 49,55 H 5,64
Gef. C 50,11 H 5,69

3-O- α -D-Glucopyranosyl- α . β -trehalose-hendecaacetat:
Das Acetat der Glucotriose reduzierte wie α . β -Trehalose-octaacetat FEHLINGSche Lösung erst nach Säurehydrolyse. Schmp. 183—184°C, $[\alpha]_D^{20}$: +110,5° ($c = 1,49$, Chloroform).

$C_{18}H_{31}O_{16} (CH_3CO)_{11}$:

Ber. Mol.-Gew. 966,8 C 49,69 H 5,63 CH_3CO 48,97
Gef. Mol.-Gew. 943* C 49,28 H 5,58 CH_3CO 47,42
DEBYE-SCHERRER-Aufnahme: 11,94 (100), 9,13 (10) 5,90 (60), 5,30 (5), 4,92 (20), 4,03 (30), 3,84 (20), 3,65 (30), 3,15 (2), 2,91 (2). Die mit dem Auge geschätzten Intensitäten wurden in Prozent der stärksten Linie angegeben.

Das aus dem partiellen Säurehydrolysat dargestellte Glucotrioseacetat erwies sich mit obigem Präparat als identisch: Schmp. 183—184°C, Mischschmp. nicht erniedrigt, $[\alpha]_D^{20}$: +111,5° ($c = 2,88$, Chloroform), +110,8° ($c = 1,05$, Chloroform).

* In Chloroform, 37°C, Dampfdruckosmometer Mechrolab, Modell 301 A.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533916_0010

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 348, S. 1256—1260, Oktober 1967

Die Umsetzung der 2-Desoxy-hexosen im Stoffwechsel, V¹

Einbau von 2-Desoxy-D-glucose in die Glucotriose von *Streptococcus faecalis*

Von JOSEF KRIEGLSTEIN* und WERNER FISCHER

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg**

(Der Schriftleitung zugegangen am 12. Juni 1967)

Zusammenfassung: Nach Züchtung von *Streptococcus faecalis* in Anwesenheit von 2-Desoxy-D-galaktose waren außer der als normaler Zellbestandteil bekannten 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α . β -trehalose drei nicht reduzierende desoxyglucosehaltige

Summary: *Streptococcus faecalis* was cultured in the presence of 2-deoxy-D-galactose. The known, normal cell component, 3-O- α -D-glucopyranosyl- α . β -trehalose, was isolated, together with two oligosaccharide fractions, which showed greater chromatographic mobility and contained deoxy sugars. Both resembled glucotriose in being non-reducing. The chromatographically slower of these two fractions consists of two monodeoxy-glucotrioses; their postulated structures are 3-O-[2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]- α . β -trehalose and 3-O- α -D-glucopyranosyl-[2-deoxy- α . β -trehalose].

Im Zuge unserer Untersuchungen über das Stoffwechselschicksal der 2-Desoxy-hexosen züchteten wir *Streptococcus faecalis* in Anwesenheit von 2-Desoxy-D-galaktose. Wir fanden in den Bakterienzellen neben noch nicht näher untersuchten Desoxyhexosephosphaten und desoxyzuckerhaltigen Oligosaccharidphosphaten drei Oligosaccharide, die nach den Analysenergebnissen als 2-Desoxy-derivate der in *Streptococcus faecalis* als Reservekohlenhydrat vorkommenden 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α . β -trehalose²⁻⁴ betrachtet werden können.

* Teil d. Dissertat. J. KRIEGLSTEIN (D 29).

** Postanschrift: Dr. W. FISCHER, 8520 Erlangen, Wasserturmstraße 3.

¹ IV. Mittel.: W. FISCHER u. G. WEIDEMANN, diese Z. **346**, 171 [1966].

² W. FISCHER u. J. KRIEGLSTEIN, diese Z. **344**, 113 [1966].

³ J. KRIEGLSTEIN u. W. FISCHER, diese Z. **344**, 209 [1966].

⁴ W. FISCHER u. J. KRIEGLSTEIN, diese Z. **348**, 1252 [1967], vorstehend.

Oligosaccharide nachweisbar. Sie wurden als Derivate der normalen Glucotriose charakterisiert, in welcher jeweils eine oder beide der außenständigen Glucosyleinheiten durch das Desoxy-derivat ersetzt sind.

The chromatographically faster fraction, which is present in small amounts, is a non-reducing trisaccharide, formed from 2 molecules of 2-deoxyglucose and 1 molecule of glucose. It is, in all probability, a dideoxy derivative of glucotriose, in which both terminal glucose residues are replaced by deoxyglucose.

Thus the conversion of 2-deoxy-galactose into 2-deoxyglucose is also shown to occur in *Streptococcus faecalis*, and it has again been shown that 2-deoxy-glucose may be incorporated into naturally occurring oligosaccharides.

Ergebnisse

Im Extrakt der in Anwesenheit von 2-Desoxy-D-galaktose gezüchteten Bakterienzellen waren papierchromatographisch neben der nur mit Silbernitrat anfärbbaren Glucotriose zwei rascher wandernde Oligosaccharidzonen nachweisbar, die sich mit dem Perchlorsäure-Aceton-Reagens in der für desoxyzuckerhaltige Verbindungen charakteristischen Weise⁵ färbten.

Die beiden Fraktionen wurden über eine Kohle-Celite-Säule gereinigt und papierchromatographisch getrennt. Sie erwiesen sich bei Papierchromatographie in Fließmittel a, b und c (s. S. 1259) sowie bei Dünnschichtchromatographie in System 1 und 2 als einheitlich. Auf den Dünnschichtchromatogrammen zeigten beide mit dem 3.5-Diamino-

⁵ G. WEIDEMANN u. W. FISCHER, diese Z. **336**, 192 [1964].

benzoesäure-Reagens die für 2-Desoxy-zucker spezifische Fluoreszenz⁶.

Nach den isolierten Mengen zu urteilen, erreichte in den Bakterienzellen die Konzentration der chromatographisch langsamer wandernden Fraktion I etwa 10%, die der rascher wandernden Fraktion II etwa 1% vom Gehalt der Glucotriose.

Fraktion I

Fraktion I ist nach milder Säurehydrolyse (0,1N H₂SO₄, 100°C, 5 Min.; 2N H₂SO₄ Raumtemp.; 30 Min.) chromatographisch nicht mehr nachweisbar. Dünnschichtchromatographisch findet man 2-Desoxy-glucose, die durch die Wanderungsgeschwindigkeit in den drei Dünnschichtsystemen und die charakteristische Fluoreszenz nach Anfärbung mit 3,5-Diamino-benzoesäure identifiziert wurde. Daneben zeigt sich eine desoxyzuckerfreie, in Höhe der Glucobiosen wandernde Verbindung, die papierchromatographisch in den Fließmitteln d und e als α , β -Trehalose charakterisiert werden konnte (vgl. I. c.²). In Spuren war außerdem eine zweite desoxyzuckerfreie Glucobiose mit dem R_F-Wert von Nigerosenachweisbar.

Nach Totalhydrolyse durch Kombination von milder Säurespaltung und Behandlung mit Maltase wurde neben 2-Desoxy-glucose nur Glucose gefunden. Für die beiden Bestandteile Glucose und Desoxyglucose wurde ein molares Verhältnis von 1,92:1 ermittelt.

Das molare Verhältnis spricht für ein Trisaccharid. Das nächst höhere Homologe, ein Hexasaccharid, kann ausgeschlossen werden, da Fraktion I chromatographisch in allen Fließmitteln rascher als Glucotriose wandert. Aufgrund der nach milder Säurehydrolyse nachgewiesenen zwei Glucobiosen ist anzunehmen, daß Fraktion I aus zwei Trisacchariden besteht, die sich durch die Stellung des Desoxyglucosylanteils im Molekül unterscheiden. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß die beiden Verbindungen sich in keinem Fließmittel trennten, was für eine nahe Strukturverwandtschaft spricht. In beiden Fällen muß die Desoxyglucose ein nicht reduzierendes Molekül bilden, da sie durch milde Säurehydrolyse vollständig freigesetzt wurde. Nach drastischer Alkalibehandlung (1N NaOH, 100°C, 45 Min.) und nachfolgender Säurehydrolyse waren Glucose und Desoxyglucose in unverminderter Menge nachweisbar. Aufgrund der damit bewiesenen Alkalistabilität (vgl. I. c.³) sind

die beiden Verbindungen von Fraktion I wie die Glucotriose aus *Streptococcus faecalis* als nicht reduzierend zu betrachten. In Übereinstimmung damit steht die aus der Hauptkomponente durch milde Säurehydrolyse freigesetzte α , β -Trehalose.

Zur Klärung der Bindungsstelle an der mittelständigen Glucoseeinheit wurde mit Perjodat oxydiert, nach Zerstörung des überschüssigen Perjodats mit Säure hydrolysiert und anschließend fermentativ auf Glucose geprüft. Gefunden wurde die Hälfte der im intakten Molekül vorhandenen Glucose. Die damit erwiesene Unangreifbarkeit der mittelständigen Glucose durch Perjodat zeigt, daß diese wie in der Glucotriose 1,3-gebunden und in Pyranoseform vorliegt (vgl. I. c.³).

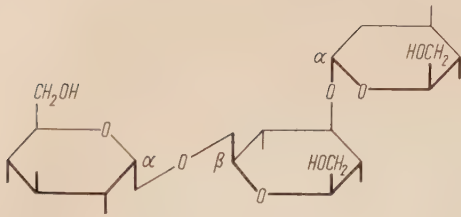
Zur Ermittlung der Ringgröße des Desoxyglucosylanteils wurde Fraktion I mit Perjodat oxydiert und nachfolgend mit Thiobarbitursäure unter Säurehydrolyse auf Malonaldehyd geprüft. Gefunden wurde 1 Mol Malonaldehyd pro Mol Desoxyglucose, womit für diese die Pyranoseform bewiesen ist, da eine Malonaldehydbildung nur möglich ist, wenn die Hydroxylgruppen an C-3 und C-4 der Desoxyglucosyleinheit nicht substituiert sind.

Fraktion I besitzt eine spezif. Drehung $[\alpha]_D^{20}$: $+137,4^0 \pm 3,9^0$. Die Berechnung aus dem $[\alpha]_D$ -Wert der Glucotriose ergibt unter Berücksichtigung einer α -Methylengruppe (vgl. I. c.¹) einen theoretischen Wert von $+130,5^0$ bis $+137,3^0$. Die spezif. Drehung zeigt somit, daß die Trisaccharide von Fraktion I wie die Glucotriose³ zwei α -Bindungen und eine β -Bindung enthalten.

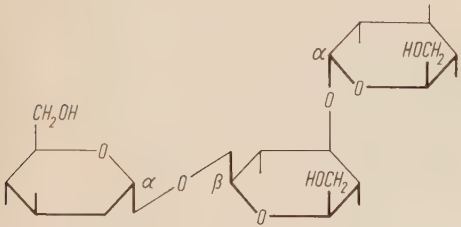
Aus den gewonnenen Ergebnissen postulieren wir für das die Hauptmenge darstellende Isomer Ia die Struktur 3-O-[2-Desoxy- α -D-glucopyranosyl]- α , β -trehalose, für das in Spuren vorliegende Isomer Ib die Struktur 3-O- α -D-Glucopyranosyl-[2-desoxy- α , β -trehalose]. Beide Verbindungen stellen demnach 2-Desoxy-derivate der Glucotriose dar, in denen jeweils die eine der beiden endständigen Glucosyleinheiten durch Desoxyglucose ersetzt ist. Bei Behandlung mit Maltase wird aus Fraktion I ausschließlich Glucose frei. Obwohl zumindest für Isomer Ia ein endständiger 2-Desoxy- α -D-glucopyranosylrest zu fordern ist, konnten wir keine freie Desoxyglucose finden, was die Vorstellung von der Unangreifbarkeit der 2-Desoxy-glucopyranoside durch Glucosidasen⁷ bestätigt. In Über-

⁷ E. FISCHER, M. BERGMANN u. H. SCHOTTE, Ber. dtsch. chem. Ges. **53**, 509 [1920]; M. BERGMANN, H. SCHOTTE u. W. LECHINSKY, ebenda **55**, 158 [1922]; B. HELFERICH u. A. ILOFF, diese Z. **221**, 252 [1933].

⁶ G. WEIDEMANN u. W. FISCHER, diese Z. **336**, 189 [1964].



Isomer Ia: 3-O-[2-Desoxy- α -D-glucopyranosyl]- α,β -trehalose



Isomer Ib: 3-O- α -D-Glucopyranosyl-[2-desoxy- α,β -trehalose]

einstimmung damit beobachteten wir früher, daß durch Maltase auch 2'-Desoxy-maltose nicht gespalten wird¹. Im Maltasehydrolysat waren chromatographisch in Höhe der 2-Desoxy-glucobiosen zwei Verbindungen nachweisbar, die sich in der für 2-Desoxy-zucker charakteristischen Weise färbten. Die hauptsächlich vorhandene Desoxyglucobiose I wanderte rascher als 2'-Desoxy-maltose, was in Übereinstimmung mit der für Isomer Ia postulierten Struktur für 2'-Desoxy-nigerose spricht (vgl. Tab.). Entsprechend dürfte es sich bei der langsamer als 2'-Desoxy-maltose wandernden, nur in Spuren vorhandenen zweiten Verbindung um 2-Desoxy- α,β -trehalose handeln.

Nach den Ergebnissen der Maltasespaltung liegt in Isomer Ia wie in der Glucotriose³ der α -Anteil der α,β -Trehalose am Molekülende. In Isomer Ib findet

$R_{2'}$ -Desoxy-maltose-Werte (R_{Dm}) der bei Maltasespaltung aus Fraktion I erhaltenen Desoxyglucobiosen im Vergleich zu den $R_{Maltose}$ -Werten (R_M) der entsprechenden Glucobiosen bei Papierchromatographie in Fließmittel e (vgl. I. c.²).

	R_{Dm}		R_M
Desoxyglucobiose I	1,20	Nigerose	1,22
Desoxyglucobiose II	0,91	α,β -Trehalose	0,96
Fraktion I	0,54	Glucotriose	0,48

sich dort der Desoxyglucosylanteil, dessen Anomerieform fermentativ nicht ermittelt werden kann. Hier beweist die Abspaltbarkeit einer Glucose die für den Nigeroseanteil zu fordernde α -Bindung.

Fraktion II

Fraktion II, welche chromatographisch rascher wandert als Fraktion I, erwies sich gleichfalls als alkalistabil. Bei milder Säurehydrolyse (0,1N H_2SO_4 100°C, 5 Min.) wird bereits vollständige Spaltung beobachtet, wonach nur Glucose und 2-Desoxyglucose nachweisbar sind. Für die beiden Bestandteile wurde ein molares Verhältnis Desoxyglucose: Glucose = 2:1,08 ermittelt.

Nach Perjodatoxydation und nachfolgender Reaktion in saurer Thiobarbitursäurelösung wurde pro Desoxyglucosyleinheit 1 Mol Malonaldehyd gefunden, was zeigt, daß beide Desoxyglucosylreste in Pyranoseform vorliegen und an C-3 und C-4 nicht substituiert sind.

Die spezif. Drehung $+123,6^0 \pm 4,7^0$ stimmt mit dem unter Berücksichtigung von zwei α -Methylengruppen aus der Glucotriose berechneten Wert von $+121,5^0$ bis $+128,5^0$ gut überein und spricht demnach auch hier für zwei α -Bindungen und eine β -Bindung im Molekül.

Aus dem molaren Verhältnis der Bestandteile kann unter Berücksichtigung der chromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit wie bei Fraktion I auf das Vorliegen eines Trisaccharids geschlossen werden. Zusammen mit der Alkalistabilität, die reduzierende Endgruppen ausschließt, und der spezif. Drehung zeigt dies die nahe Strukturverwandtschaft zur Glucotriose. Berücksichtigt man, daß beide Desoxyglucosylreste durch milde Säurehydrolyse freigesetzt werden und an C-3 wie C-4 nicht substituiert sind, so sind die Ergebnisse am ehesten mit einer Struktur vereinbar, in welcher die beiden außenständigen Glucosylreste der Glucotriose durch das Desoxyderivat ersetzt sind. Die Substanzmenge reichte nicht aus, um das nach dieser Struktur bei Perjodatoxydation zu fordernde vollständige Intaktbleiben der im Molekül vorhandenen Glucose zu prüfen.

Diskussion

Das Auftreten von 2-Desoxy-glucose in den beschriebenen Oligosacchariden nach Verabfolgung von 2-Desoxy-galaktose bestätigt die Ummwandlungsmöglichkeit der beiden Desoxyhexosen ineinander auch für *Streptococcus faecalis*. Sie erfolgt

nach Untersuchungen an Hefen^{8,9} und Blütenpflanzen¹⁰ durch die Fermente des Galaktosestoffwechsels auf dem LELOIR-Weg.

Da hierbei Nucleosiddiphosphat-2-desoxy-hexosen auftreten^{8,10-12}, wurde wahrscheinlich, daß die 2-Desoxy-hexosen aus dem Nucleotidverband durch Saccharidsynthetasen übertragen und zur Saccharidsynthese verwendet werden. In entsprechenden Versuchen an Pflanzen wurde der strukturgerechte Einbau von 2-Desoxy-hexosen anstelle der normalen Zucker in natürlich vorkommende Saccharide durch Isolierung von 2-Desoxy-saccharose^{13,14}, 2'-Desoxy-maltose¹ und 1-O-[2-Desoxy- β -D-galaktopyranosyl]-glycerin¹⁴ bereits mehrfach bewiesen. In dieselbe Richtung weisen die vorliegenden Ergebnisse, nach denen in der nicht reduzierenden Glucotriose von *Streptococcus faecalis* jeweils einer und wahrscheinlich auch beide der außenständigen Glucosylreste durch das 2-Desoxyderivat ersetzt werden können. Die α -pyranosidische Bindung der Desoxyglucose in Isomer Ia läßt am strukturgerechten Einbau auch hier keinen Zweifel.

Beschreibung der Versuche

Materialien: 2-Desoxy-D-glucose, 2-Desoxy-D-galaktose und Maltase wurden von Nutritional Biochemicals Corporation, die Biochemica-Testkombination TC-X zur Glucosebestimmung von Boehringer & Söhne bezogen. O-Methyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid wurde nach der Vorschrift von HUGHES und Mitarb.¹⁵ dargestellt, 2'-Desoxy-maltose stammte aus den vorausgehenden Versuchen¹.

Papierchromatographie: Chromatographiert wurde auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl absteigend im Durchlauf bei 18°C. Als Fließmittel wurden verwendet: a) Äthylacetat/Pyridin/Eisessig/Wasser 5:5:1:3, b) Amylalkohol/Pyridin/Wasser 7:7:6, c) Butanol-(1)/Pyridin/Wasser 6:4:3, d) Äthylacetat/Pyridin/Wasser 8:2:1, e) Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser 7:1:2. Die Laufzeit betrug bei Fließmittel a) und b)

24 Std., bei c) und d) 120 Std., bei e) zur Trennung normaler bzw. desoxyzuckerhaltiger Glucobiosen 72 bzw. 48 Std. Die Färbung wurde mit Perchlorsäure-Aceton⁵, die Reinheitsprüfung mit Silbernitrat¹⁶ durchgeführt und zum Nachweis von Phosphaten wurde Perchlorsäure-Molybdat-Reagens¹⁷ verwendet.

Dünnschichtchromatographie: Zur Benützung kamen folgende Systeme: System 1: Kieselgel G, aktiviert; Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser 7:2:1. System 2: Kieselgur, aktiviert; Butanol-(1)/ α , α' -Lutidin/Wasser 6:3:1. System 3: Kieselgel G, aktiviert; Äthylacetat/Propanol-(2)/Wasser 65:23:12. Färbung mit dem 3,5-Diamino-benzoesäure-Reagens, wobei 2-Desoxyzucker durch die charakteristische Fluoreszenz im kurzwelligen UV-Licht⁶, Aldohexosen und desoxyzuckerfreie Saccharide durch die fehlende Fluoreszenz und die Braunfärbung am Tageslicht² identifiziert wurden.

Quantitative Methoden: Die Messung der 2-Desoxyglucose erfolgte mit der Thiobarbitursäuremethode¹³. D-Glucose wurde mittels Hexokinase (EC 2.7.1.1) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) im optischen Test gemessen, wobei 2-Desoxy-D-glucose das Meßergebnis unbeeinflusst läßt.

Darstellung der desoxyzuckerhaltigen Oligosaccharide: Die Züchtung und Aufarbeitung von *Streptococcus faecalis* (Stammkultur aus dem Department of Bacteriology of Nebraska) erfolgte wie in l. c.² beschrieben. Die Nährlösung enthielt 0,01 % 2-Desoxy-D-galaktose und als utilisierbares Kohlenhydrat 0,5 % D-Galaktose. Der von Eiweiß und Lipiden befreite Zelleextrakt wurde primär zum Nachweis desoxyzuckerhaltiger Phosphatester auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043 b (gewaschen) mit Propanol-(1)/33proz. Ammoniak/Wasser 6:3:1 24 Std. bei 18°C absteigend chromatographiert. Dabei fanden sich zwischen den freien Desoxyhexosen und den Desoxyhexosephosphaten zwei nur wenig getrennte desoxyzuckerhaltige Zonen, die einen negativen Phosphatnachweis gaben. Die gemeinsam eluierten Zonen wurden auf eine Kohle-Celite-Säule gebracht, diese mit Wasser und 3proz. Äthanol gewaschen und die desoxyzuckerhaltigen Verbindungen mit 20proz. Äthanol eluiert. Durch präparative Papierchromatographie mit Fließmittel a wurden zwei gut getrennte Fraktionen (I und II) erhalten, diese mit Wasser aus dem Papier eluiert und die eingengten Extrakte nach chromatographischer Reinheitsprüfung zur Charakterisierung der Verbindungen verwendet.

Charakterisierung von Fraktion I*

Bestimmung der Bestandteile: Zur Freisetzung der Desoxyglucose wurden 2 cm³ Oligosaccharidlösung mit

⁸ W. FISCHER u. G. WEIDEMANN, diese Z. **336**, 195 [1964].

⁹ H. DE ROBICHON SZULMAYSTER, Ann. Technol. agric. **10**, 81 [1961].

¹⁰ W. FISCHER u. G. WEIDEMANN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **93**, 677 [1964].

¹¹ M. TICHÁ, persönl. Mitteil.

¹² P. BIELY u. S. BAUER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **121**, 213 [1966].

¹³ G. WEIDEMANN u. W. FISCHER, diese Z. **342**, 238 [1965].

¹⁴ W. FISCHER, Habilitationsschrift, Erlangen 1967.

¹⁵ I. W. HUGHES, W. G. OVEREND u. M. STACEY, J. chem. Soc. [London] **1949**, 2846.

¹⁶ G. H. SCHMIDT u. H. BRUNNERT, J. Chromatogr. [Amsterdam] **10**, 190 [1963].

¹⁷ S. BURROWS, F. S. M. GRYLLS u. J. S. HARRISON, Nature [London] **170**, 800 [1952].

* Die Analysenergebnisse sind, sofern nicht anders vermerkt, auf 1 cm³ des jeweiligen Reaktionsansatzes berechnet.

0,1 cm³ 2N H₂SO₄ versetzt und 10 Min. unter Verschluss auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Das mit 0,1 cm³ 2N NaOH neutralisierte Gemisch wurde zur Spaltung der Glucobiosen mit 1 cm³ 1,5proz. Maltaselösung (0,1M Phosphatpuffer, pH 6,5) durchmischt und 6 Std. bei 37°C inkubiert. Nachdem hiernach chromatographisch nur mehr Monosaccharide nachweisbar waren, wurden aliquote Teile zur Messung von Desoxyglucose und Glucose verwendet. Gefunden wurden 1,20 µMol 2-Desoxy-glucose und 2,30 µMol D-Glucose pro cm³; molares Verhältnis 1:1,92.

Prüfung der Alkalistabilität: 1 cm³ Oligosaccharidlösung wurde mit 0,1 cm³ 10N NaOH versetzt und in zugeschmolzener Ampulle 45 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden 0,2 cm³ 10N H₂SO₄ zugegeben. Im Vergleichsansatz wurde die Oligosaccharidlösung nach der Säurezugabe beigemischt.

Ein Teil der Lösungen wurde 1 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und danach zur Bestimmung der Desoxyglucose verwendet. Gefunden im alkalibehandelten Ansatz: 1,31 µMol/cm³, im Vergleichsansatz 1,29 µMol/cm³.

Ein zweiter Teil wurde in zugeschmolzener Ampulle 4 Std. im siedenden Wasserbad belassen und nach Neutralisation zur fermentativen Glucosemessung verwendet. Gefunden im alkalibehandelten Ansatz: 2,21 µMol/cm³, im Vergleichsansatz 2,28 µMol/cm³.

Prüfung auf durch Perjodat nicht angreifbare Glucosylreste: 0,2 cm³ Oligosaccharidlösung wurden mit 0,2 cm³ 0,5M Acetatpuffer (pH 4,6) und 0,3 cm³ 0,25M NaJO₄ versetzt und 15 bzw. 24 Std. bei 40°C im Dunkeln belassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,6 cm³ 1M NaAsO₂ unterbrochen. Im Vergleichsansatz wurde das Perjodat vor Zugabe der Oligosaccharidlösung zerstört. Sämtliche Ansätze wurden mit je 0,2 cm³ 5N H₂SO₄ versetzt und in zugeschmolzener Ampulle 7 Std. im siedenden Wasserbad hydrolysiert. An Glucose gefunden im nichtoxydierten Vergleichsansatz: 0,368 µMol/cm³, nach 15stdg. Oxydation: 0,183 µMol/cm³, nach 24stdg. Oxydation: 0,181 µMol/cm³, das sind 49,6 und 49,3% der im nicht oxydierten Molekül vorhandenen Glucose. In Kontrollversuchen mit Trehalose wurden nach 24stdg. Oxydation 2 bis 3% der ursprünglich vorhandenen Glucosemenge gefunden.

Prüfung auf Substitution des Desoxyglucosylanteils an C-3 und C-4*: 0,1 cm³ Oligosaccharidlösung wurden mit 0,5 cm³ 0,5M Acetatpuffer (pH 4,6) und 1 cm³ 0,25M NaJO₄ versetzt und 22 Std. bei 40°C im Dunkeln belassen. Anschließend wurden 4 cm³ 1M NaAsO₂ und 6,25 cm³ 1N H₂SO₄ zugesetzt und mit Wasser auf 50 cm³ aufgefüllt. 1 cm³ der verdünnten Lösung wurde mit 3 cm³ Thiobarbitursäurereagens versetzt und die Malonaldehydbestimmung in der üblichen Weise¹⁸ durch-

¹⁸ H. W. AUGUSTIN u. E. HOFMANN, Acta biol. med. german. 11, 628 [1963].

* Für diese und die nachfolgenden Untersuchungen war die Oligosaccharidlösung auf etwa $\frac{1}{6}$ des ursprünglichen Volumens eingengt worden.

geführt. Als Standard wurde anstelle von 2-Desoxyglucose eine durch Einwaage bekannte Lösung von O-Methyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid mitgeführt. Gefunden: 12,3 µMol Malonaldehyd/cm³ Oligosaccharidlösung. Der Desoxyglucosegehalt, bestimmt nach Säurehydrolyse des Oligosaccharids, betrug $12,56 \pm 0,37$ µMol/cm³.

Verhalten gegen Maltase: 0,5 cm³ Oligosaccharidlösung wurden mit gleichen Teilen 1proz. Maltaselösung in 0,1M Phosphatpuffer (pH 6,5) bei 30°C inkubiert. Nach 4 Std. war etwa die Hälfte des Oligosaccharids gespalten. Auf freigesetzte Monosaccharide wurde dünnschichtchromatographisch in System 1 geprüft; die entstandenen Desoxyglucobiosen wurden mit 2'-Desoxy-maltose als Vergleichssubstanz durch Papierchromatographie in Fließmittel e (s. S. 1259) getrennt.

Optische Drehung: Die Messung erfolgte im 10-cm-Mikrorohr mit dem lichtelektrischen Präzisionspolariometer 0,005⁰ der Fa. Zeiss. Verwendet wurde die konzentrierte Lösung von Fraktion I, deren Konzentration durch Messung der bei milder Säurehydrolyse freigesetzten Desoxyglucose ($12,56 \pm 0,37$ µMol/cm³) unter Annahme einer Monodesoxyglucotriose berechnet wurde. $[\alpha]_D^{20}$: $+137,4^0 \pm 3,9^0$ ($c = 0,614 \pm 0,017$, Wasser).

Charakterisierung von Fraktion II*

Bestimmung der Bestandteile: Ein Teil der Lösung von Fraktion II wurde in 0,2N H₂SO₄ 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, wonach sich das Oligosaccharid bei Dünnschichtchromatographie in System 1 als völlig gespalten erweist und nur Desoxyglucose und Glucose gefunden wurden.

Aliquote Teile des Hydrolysats wurden zur Messung der Bestandteile verwendet. Gefunden: 3,48 µMol Glucose/cm³, 6,43 µMol 2-Desoxy-glucose/cm³; molares Verhältnis 1,08:2.

Optische Drehung: Die Messung erfolgte wie bei Fraktion I. Die Konzentration wurde aus den Werten der Bestandteilbestimmung unter Annahme einer Didesoxyglucotriose berechnet. $[\alpha]_D^{20}$: $+123,6^0 \pm 4,7^0$ ($c = 0,164$ bzw. 0,152, Wasser).

Prüfung der Alkalistabilität: Die Durchführung erfolgte wie bei Fraktion I, jedoch wurde die zur Bestandteilbestimmung notwendige Hydrolyse, um Verluste an Desoxyglucose zu vermeiden, unter milderen Bedingungen (0,2N H₂SO₄, 100°C, 5 Min.) ausgeführt. Gefunden: 3,05 µMol Glucose/cm³, 6,33 µMol 2-Desoxyglucose/cm³; molares Verhältnis 0,96:2.

Prüfung auf Substitution der Desoxyglucosylreste an C-3 und C-4: Die Prüfung erfolgte wie bei Fraktion I beschrieben. Gefunden: 6,93 µMol Malonaldehyd/cm³, d. i. 1,08 Mol pro Mol im Hydrolysat bestimmter 2-Desoxy-glucose.

* Sämtliche Analysenergebnisse sind auf 1 cm³ der Oligosaccharidlösung berechnet.

Lebenslauf

Am 10. März 1938 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Lambert Krieglstein und seiner Ehefrau Berta, geb. Steidl, in Pechgrün (Sudetenland) geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1946 bis 1948 und der Privaten Realschule in Eschenbach (Oberpf.) bis 1954, legte ich 1957 an der Oberrealschule in Weiden (Oberpf.) die Reifeprüfung ab. Nach der zweijährigen pharmazeutischen Praktikantenzeit begann ich im Wintersemester 1959/60 das Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-Nürnberg, das ich im März 1962 mit der pharmazeutischen Staatsprüfung beendete. Im September 1964 erhielt ich die Approbation als Apotheker. Bereits während des Pharmaziestudiums habe ich mich im Wintersemester 1960/61 zusätzlich für Medizin eingeschrieben. Im Oktober 1962 erfolgte die Restprüfung in dem Fach Zoologie der naturwissenschaftlichen ärztlichen Vorprüfung und im Sommersemester 1963 die ärztliche Vorprüfung. Neben meinem klinischen Studium war ich von September 1963 bis Juli 1966 mit wissenschaftlichen Experimenten im Institut für physiologische Chemie beschäftigt und wurde im Dezember 1965 zum Doktor der Naturwissenschaften promoviert. Nach bestandenem medizinischen Staatsexamen am 30.1.1967 trat ich eine Stelle als wissenschaftlicher Assistent am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz an.

